

10/537614
537, 614

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
24. Juni 2004 (24.06.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/052926 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 14/435,
A01K 67/00

(74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER HEALTHCARE AG;
Law & Patents, Patents and Licensing, 51368 Leverkusen
(DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/013281

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
26. November 2003 (26.11.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 57 354.9 9. Dezember 2002 (09.12.2002) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US*): BAYER HEALTHCARE AG [DE/DE]; 51368 Lev-
erkusen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): GOLZ, Stefan
[DE/DE]; Bückmannsmühle 46, 45326 Essen (DE).
MARKOVA, Svetlana [RU/RU]; Akademgorodok,
12a-68, Krasnoyarsk, 660036 (RU). BURAKOVA, Lud-
mila [RU/RU]; Solnechnaya St., 9-32, Sosnovoborsk,
662500 (RU). FRANK, Ludmila [RU/RU]; Akadem-
gorodok, 19-82, Krasnoyarsk, 660036 (RU). VYSOTSKI,
Eugene [RU/RU]; Lado Kechoveli St., 35-108, Krasno-
yarsk, 660100 (RU).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: ISOLATED FLUORESCENT PROTEIN FROM *CLYTIA GREGARIA* CGFP AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: ISOLIERTES FLUORESZIERENDES PROTEIN AUS *CLYTIA GREGARIA* CGFP, SOWIE DESSEN VER-
WENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to the nucleotide and amino acid sequence, in addition to the activity and use of the fluorescent
protein CGFP (fluorescent protein from *clytia gregaria*).

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Nukleotid- und Aminosäuresequenz, sowie die Aktivität und Verwendung des
fluoreszierenden Proteins CGFP (fluoreszierendes Protein aus *clytiagregaria*).

WO 2004/052926 A1

ISOLIERTES FLUORESZIERENDES PROTEIN AUS CLYTIA GREGARIA (CGFP), SOWIE DESSEN VERWENDUNG

Die Erfindung betrifft die Nukleotid- und Aminosäuresequenz, sowie die Aktivität und Verwendung des fluoreszierenden Proteins CGFP (fluorescence protein of clytia gregaria).

Fluoreszierende Proteine

Eine Vielzahl an Coelenteraten sind biolumineszent (Morin et al., 1974) und emittieren blaues oder grünes Licht. Das 1962 als erstes Licht produzierendes Protein identifizierte Aequorin aus Aequoria victoria (Shimomura et al., 1962) emittierte als isoliertes Protein ein blaues Licht und nicht wie das phenotypisch beobachtete grüne Licht von Aequoria victoria. Später konnte das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus Aequoria victoria isoliert werden, das Aufgrund der Anregung durch das Aequorin die Meduse phenotypisch grün erscheinen lässt (Johnson et al, 1962; Hastings et al., 1969; Inouye et al, 1994).

Grün fluoreszierende Proteine konnten aus unterschiedlichen Organismen isoliert werden. Hierzu zählen die Hydrozoa (aequoria, halistaura obelia) und Anthropoden (acanthotilum, sea cactus, cavernularia, renila, ptilosarcus, stylatula) (Morin et al., 1971; Morin et al., 1971 II, Wampler et al., 1971, Wampler et al., 1973, Cormier et al., 1973, Cormier et al., 1974, Levine et al., 1982).

Eine Zusammenfassung einiger fluoreszierender Proteine findet sich in Tabelle 1:

Tabelle 1:

Übersicht über einige fluoreszierende Proteine. Angegeben ist der Name, der Organismus aus dem das Protein isoliert worden ist und die Identifikationsnummer (Acc. No.) des Datenbankeintrages.

Name	Organismus	Identifikations Nr.
Green fluorescent protein	Aequorea macrodactyla	AF435433
Green fluorescent protein	Aequoria	L29345
Green fluorescent protein-like protein	Agaricia agaricites	AY037775
Green fluorescent protein-like protein	Agaricia fragilis	AY037765
Green fluorescent protein	Dendronephthya	AF420591
Red fluorescent protein	Entacmaea quadricolor	AY130757
Green fluorescent protein-like protein	Caribbean anemone	AY037777
Green fluorescent protein	Heteractis crispa	AF420592
Green fluorescent protein-like protein	Montastraea annularis	AY037766
Green fluorescent protein-like protein	Montastraea cavernosa	AY037768
Cyan fluorescent protein	Montastraea cavernosa	AY056460
Green fluorescent protein	Renilla muelleri	AY015996
Green fluorescent protein	Renilla reniformis	AF372525
Green fluorescent protein-like protein	Ricordea florida	AY037774

Die fluoreszierenden Proteine unterscheiden sich nicht nur aufgrund ihrer Nukleotid- und Aminosäuresequenz, sondern auch aufgrund ihrer biochemischen und physikalischen Eigenschaften. Die spektralen Charakteristika der fluoreszierenden Proteine können sich sowohl auf der Excitations- als auch auf der Emissionsseite unterscheiden. Eine Übersicht der Spektren der Fluoreszenz und der Anregungswellenlänge findet sich in Tabelle 2.

Tabelle 2:

Übersicht über einige fluoreszierende Proteine. Angegeben ist der Organismus aus dem das Protein isoliert worden ist, die Anregungs- und Emissionswellenlängen, die bei Spektralanalysen bestimmt worden sind.

Organismus	Anregung	Fluoreszenz
Aequoria	465-498 nm	509 nm
Halistaura	465 nm	497 nm
Phialidium	485 nm	498 nm
Renilla	498 nm	508 nm

Die Verwendung von fluoreszierenden Proteinen wurde bereits zuvor beschrieben. Eine Übersicht findet sich in Tabelle 3:

Tabelle 3:

Übersicht über einige fluoreszierende Proteine. Angegeben ist der Organismus aus dem das Protein isoliert worden ist, der Name des fluoreszierenden Proteins und eine Auswahl an Patenten bzw. Anmeldungen.

Organismus	Fluoreszierendes Protein	Patent / Anmeldung
Renilla mulleri	GFP	US patent no. 6,436,682 WO200168824 WO200257451 WO200134824 WO9949019 US patent no. 6,232,107

Organismus	Fluoreszierendes Protein	Patent / Anmeldung
Aequoria	GFP	WO200071565 WO9711094 WO9623898 US patent no. 5,958,713 US patent no. 6,172,188

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Veränderung der Aminosäuresequenz von fluoreszierenden Proteinen die physikalischen und biochemischen Eigenschaften verändert werden können. Beispiele von mutagenisierten fluoreszierenden Proteinen sind in der Literatur beschrieben (Delagrave et al., 1995; Ehrig et al., 1995; Heim et al., 1996).

Fluoreszierende Proteine finden bereits in unterschiedlichsten Gebieten eine Anwendung. Die Verwendung von fluoreszierende Proteinen beim 'Fluorescence Resonance Energy Transfer' (FRET), 'Bioluminescence Resonance Energy Transfer' (BRET) und anderen Energietransferverfahren wurde bereits in der Literatur beschrieben (Mitra et al., 1996; Ward et al., 1978; Cardullo et al., 1988; US patent no. 4,777,128; US patent no. 5,126,508; US patent no. 4,927,923; US patent no. 5,279,943). Weitere Nicht-radioaktive Methoden zum Energietransfer mittels GFP wurden in ebenfalls bereits beschrieben (PCT appl. WO 98/02571 and WO 97/28261)

Reportersysteme

Als Reporter- oder Indikatorgen bezeichnet man generell Gene, deren Genprodukte sich mit Hilfe einfacher biochemischer oder histochemischer Methoden leicht nachweisen lassen. Man unterscheidet mindestens 2 Typen von Reporter genen.

1. Resistenzgene. Als Resistenzgene werden Gene bezeichnet, deren Expression einer Zelle die Resistenz gegen Antibiotika oder andere Substanzen verleiht, deren Anwesenheit im Wachstumsmedium zum Zelltod führt, wenn das Resistenzgen fehlt.

5

2. Reportergen. Die Produkte von Reportergenen werden in der Gentechnologie als fusionierte oder unfusionierte Indikatoren verwendet. Zu den gebräuchlichsten Reportergenen gehört die beta-Galaktosidase (Alam et al., 1990), alkalische Phosphatase (Yang et al., 1997; Cullen et al., 1992), Luciferasen und andere Photoproteine (Shinomura, 1985; Phillips GN, 1997; Snowdowne et al., 1984).

10

Als Lumineszenz bezeichnet man die Abstrahlung von Photonen im sichtbaren Spektralbereich, wobei diese durch angeregte Emittermoleküle erfolgt. Im Unterschied zur Fluoreszenz wird hierbei die Energie nicht von Außen in Form von Strahlung kürzerer Wellenlänge zugeführt.

15

Man unterscheidet Chemilumineszenz und Biolumineszenz. Als Chemolumineszenz bezeichnet man eine chemische Reaktion die zu einem angeregten Molekül führt, das selbst leuchtet, wenn die angeregten Elektronen in den Grundzustand zurückkehren. Wird diese Reaktion durch ein Enzym katalysiert, spricht man von Biolumineszenz. Die an der Reaktion beteiligten Enzyme werden generell als Luziferasen bezeichnet.

20

Einordnung der Spezies *Clytia gregaria*

25

Cnidaria→Leptomedusae→Campanulariidae→ *Clytia gregaria*

Die Spezies *Clytia gregaria* gehört zu den Cnidaria, speziell zu den Medusen. Der biolumineszente bzw. fluoreszente Phänotyp wurde bereits 1998 beschrieben (Ward et al., 1998).

30

Isolierung der cDNA

Zur Untersuchung der fluoreszenten Aktivität der Spezies *Clytia gregaria* wurden Exemplare im Friday Harbor in Washington State (USA) gefangen und in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Herstellung der cDNA-Bibliothek wurde ausschließlich der biolumineszente Ring eines Medusenexemplars verwendet. Zur Erstellung der cDNA-Bibliotheken von *Clytia gregaria*, wurde die RNA nach der Methode von Krieg (Krieg et al., 1996) durch Isothiocyanat isoliert.

Zur Herstellung der cDNA wurde eine RT-PCR durchgeführt. Hierzu wurden 10 µg RNA mit Reverser Transkriptase (Superscript Gold II) nach folgendem Schema inkubiert:

PCR	1.	30	Sekunden	95°C
	2.	6	Minuten	68°C
	3.	10	Sekunden	95°C
	4.	6	Minuten	68°C

17 Zyklen von Schritt 4 nach Schritt 3

Die Reaktionsprodukte wurden zur Inaktivierung der Polymerase für 30 Minuten bei 37°C mit Proteinase K inkubiert und die cDNA mit Ethanol präzipitiert. Die cDNA wurde in Wasser gelöst und mit SfiI für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden zur Abtrennung kleiner Fragmente gelfiltriert. Die fraktionierte cDNA wurde anschließend in den SfiI geschnittenen und dephosphorilierten λTriplEx2 Vector ligiert. Zur Herstellung einer λ-Phagen Expressionsbank wurden die klonierten cDNA-Fragmente anschließend durch das in vitro Verpackungssystem SMART cDNA Library Construction Kits (Clontech) in λ-Phagen verpackt.

Die Identifizierung der rekombinaten Phagen, die eine cDNA Insertion mit potentieller Expression von fluoreszenten Proteinen enthielten, wurde ein „library screening“ durchgeführt.

- 5 Hierzu wurden Bakterienrasen aus transformierten E. coli XL1-Blue auf 90 mm Kulturschalen plattiert und für 12-15 Stunden bei 31°C inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression durch die Zugabe von 60 µl einer 20 mM IPTG (Isopropylthiogalactoside) Lösung auf die Platten gestartet. Nach einer Inkubation 24 Stunden bei Raumtemperatur wurden die Platten für 72 Stunden bei 4 °C gelagert.
- 10 Anschliessend erfolgte die Messung der Fluoreszenz.

Hierzu wurden die Bakterien mit einem Argon-Laser (LGN502) mit 100 mV bei 488 nm oder 366 nm (UVL21) bestrahlt. Die Fluoreszenz wurde unter Verwendung eines 510 nm ZSV Filters gemessen.

- 15 Zur Isolierung der Klone und spektralen Analyse wurde die Biomasse der Fluoreszenz positiven Klone von den Kulturplatten entfernt und in PBS (phosphate buffed saline) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall. Nach der Klärung des Lysates durch Zentrifugation wurde die Fluoreszenz des Überstandes im
- 20 Fluorometer bestimmt.

Es wurde ein fluoreszierendes Protein identifiziert. Das fluoreszierende Protein wurde als CGFP (fluorescence protein of clytia gregaria) bezeichnet. Im Folgenden wird das fluoreszierende Protein CGFP im einzelnen dargestellt.

25

CGFP

- Das fluoreszierende Protein CGFP zeigt die höchste Homologie auf Aminosäureebene zu GFP aus Aequoria mit einer Identität von 44 % (gezeigt in Beispiel 8;
- 30 Figur 5). Auf Nukleinsäureebene liegt die Identität unter 30 % (gezeigt in Beispiel 9;

Figur 6). Zum Sequenzvergleich wurde das BLAST-Verfahren verwendet (Altschul et al., 1997).

Die Erfindung betrifft auch funktionelle Äquivalente von CGFP. Funktionelle Äquivalente sind solche Proteine, die vergleichbare physikochemische Eigenschaften haben und mindestens 70 % homolog sind. Bevorzugt ist eine Homologie von 80 % oder 90 %. Besonders bevorzugt ist eine Homologie von 95 %.

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Reportergen für zelluläre Systeme speziell für Rezeptoren, für Ionenkanäle, für Transporter, für Transkriptionsfaktoren oder für induzierbare Systeme.

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Reportergen in bakteriellen und eukaryotischen Systemen speziell in Säugerzellen, in Bakterien, in Hefen, in Bakulo, in Pflanzen

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Reportergene für zelluläre Systeme in Kombination mit biolumineszenten oder chemolumineszenten Systemen speziell Systemen mit Luziferasen, mit Oxygenasen, mit Phosphatasen.

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Markerprotein, speziell bei der FACS (Fluorescence activated cell sorter) Sortierung.

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Fusionsprotein speziell für Rezeptoren, für Ionenkanäle, für Transporter, für Transkriptionsfaktoren, für Proteinasen, für Kinasen, für Phosphodiesterasen, für Hydrolasen, für Peptidasen, für Transferasen, für Membranproteine, für Glykoproteine.

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich zur Immobilisierung speziell durch Antikörper, durch Biotin, durch magnetische oder magnetisierbare Träger.

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Protein für Systeme des Energietransfers speziell der FRET- (Fluorescence Resonance Energy Transfer), ,BRET- (Bioluminescence Resonance Energy Transfer), FET (field effect transistors), FP (fluorescence polarization), HTRF (Homogeneous time-resolved fluorescence) Systemen.

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Markierung von Substraten oder Liganden speziell für Proteasen, für Kinasen, für Transferasen.

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich zur Expression in bakteriellen Systemen speziell zur Titerbestimmung, als Substrate für biochemische Systeme speziell für Proteinasen und Kinasen.

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Marker speziell gekoppelt an Antikörper, gekoppelt an Enzyme, gekoppelt an Rezeptoren, gekoppelt an Ionenkanäle und andere Proteine.

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Reportergen bei der pharmakologischen Wirkstoffsuche speziell im HTS (High Throughput Screening).

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Komponente von Detektionssystemen speziell für ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), für Immunohistochemie, für Western-Blot, für die konfokale Mikroskopie.

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Marker für die Analyse von Wechselwirkungen speziell für Protein-Protein-Wechselwirkungen, für DNA-Protein-Wechselwirkungen, für DNA-RNA-Wechselwirkungen, für RNA-RNA-Wechselwirkungen, für RNA-Protein-Wechselwirkungen (DNA : deoxyribonucleic acid; RNA : ribonucleic acid;).

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Marker oder Fusionsprotein für die Expression in transgenen Organismen speziell in Mäusen, in Ratten, in Hamstern und anderen Säugetieren, in Primaten, in Fischen, in Würmern, in Pflanzen.

- 5 Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Marker oder Fusionsprotein zur Analyse der Embryonalentwicklung.

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Marker über einen Kopplungsvermittler speziell über Biotin, über NHS (N-hydroxysulfosuccimide), über CN-Br.

10

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Reporter gekoppelt an Nukleinsäuren speziell an DNA, an RNA.

15

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Reporter gekoppelt an Proteine oder Peptide.

20

Das an Nukleinsäuren oder Peptiden gekoppelte fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Sonde speziell für Northern-Blots, für Southern-Blots, für Western-Blots, für ELISA, für Nukleinsäuresequenzierungen, für Proteinanalysen, Chip-Analysen.

25

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich Markierung von pharmakologischen Formulierungen speziell von infektiösen Agentien, von Antikörpern, von „small molecules“.

30

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich für geologische Untersuchungen speziell für Meeres-, Grundwasser- und Flussströmungen.

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich zur Expression in Expressionssystemen speziell in in-vitro Translationssystemen, in bakteriellen Systemen, in Hefen Systemen, in Bakulo Systemen, in viralen Systemen, in eukaryotischen Systemen.

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich zur Visualisierung von Geweben oder Zellen bei chirurgischen Eingriffen speziell bei invasiven, bei nicht-invasiven, bei minimal-invasiven.

5

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich auch zur Markierung von Tumorgeweben und anderen phänotypisch veränderten Geweben speziell bei der histologischen Untersuchung, bei operativen Eingriffen.

10

Die Erfindung betrifft auch die Reinigung des fluoreszierenden Proteins CGFP speziell als wildtyp Protein, als Fusionsprotein, als mutagenisiertes Protein.

15

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des fluoreszierenden Proteins CGFP auf dem Gebiet der Kosmetik speziell von Badezusätzen, von Lotionen, von Seifen, von Körperfarben, von Zahncreme, von Körperpudern.

20

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des fluoreszierenden Proteins CGFP zur Färbung speziell von Nahrungsmitteln, von Badezusätzen, von Tinte, von Textilien, von Kunststoffen.

25

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des fluoreszierenden Proteins CGFP zur Färbung von Papier speziell von Grußkarten, von Papierprodukten, von Tapeten, von Bastelartikeln.

30

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des fluoreszierenden Proteins CGFP zur Färbung von Flüssigkeiten speziell für Wasserpistolen, für Springbrunnen, für Getränke, für Eis.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des fluoreszierenden Proteins CGFP zur Herstellung von Spielwaren speziell von Fingerfarbe, von Schminke.

Die Erfindung bezieht sich desweiteren auf Nukleinsäuremoleküle, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- 5 a) Nukleinsäuremolekülen, die das Polypeptid offenbart durch SEQ ID NO: 2 kodieren;
- b) Nukleinsäuremolekülen, welche die durch SEQ ID NO: 1 dargestellte Sequenz enthalten;
- 10 c) Nukleinsäuremolekülen, deren komplementärer Strang mit einem Nukleinsäuremolekül aus a) oder b) unter stringenten Bedingungen hybridisiert und welche die biologische Funktion eines fluoreszierenden Proteins aufweisen;
- 15 d) Nukleinsäuremolekülen, welche sich auf Grund der Degenerierung des genetischen Kodes von den unter c) genannten unterscheiden;
- e) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 95% zu SEQ ID NO: 1 zeigen, und welche die biologische Funktion eines
20 fluoreszierenden Proteins aufweisen; und
- f) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 65% zu SEQ ID NO: 1 zeigen, und welche die biologische Funktion eines
25 fluoreszierenden Proteins aufweisen.

Die Erfindung betrifft die oben genannten Nukleinsäuremoleküle, bei denen die Sequenz einen funktionalen Promotor 5' zur Sequenz enthält.

Die Erfindung betrifft auch Nukleinsäuremoleküle wie vorhergehend beschrieben,
30 die Bestandteil von rekombinanten DNA oder RNA Vektoren sind.

Die Erfindung betrifft Organismen, die einen solchen Vektor enthalten.

Die Erfindung bezieht sich auf Oligonukleotide mit mehr als 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, die identisch oder komplementär zur DNA oder RNA Sequenz der CGFP Moleküle sind.

Die Erfindung betrifft fluoreszierende Proteine, die durch die vorhergehend beschriebenen Nukleotidsequenzen kodiert sind.

Die Erfindung bezieht sich auf Verfahren zur Expression der erfindungsgemässen fluoreszierenden Polypeptide in Bakterien, eukaryontischen Zellen oder in *in vitro* Expressionssystemen.

Die Erfindung betrifft auch Verfahren zur Aufreinigung/Isolierung eines erfindungsgemässen fluoreszierenden Polypeptides.

Die Erfindung bezieht sich auf Peptide mit mehr als 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren, die immunologisch durch Antikörper gegen die erfindungsgemässen fluoreszierende Proteine erkannt werden.

Die Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemässen fluoreszierenden Proteine als Marker- und Reportergene, insbesondere für die pharmakologische Wirkstoffsuche und Diagnostik.

Expression der erfindungsgemässen fluoreszierenden Proteine

Als Expression bezeichnet man die Produktion eines Moleküls, das nach dem Einbringen des Gens in eine geeignete Wirtszelle die Transcription und Translation des in einen Expressionsvektor klonierte Fremdgen erlaubt. Expressionsvektoren enthalten die für die Expression von Genen in Zellen von Prokaryoten oder Eukaryonten erforderlichen Kontrollsignale.

Expressionsvektoren können prinzipiell auf zwei verschiedene Weisen konstruiert werden. Bei den sogenannten Transcriptionsfusionen wird das vom einklonierten Fremdgen codierte Protein als authentisches, biologisch aktives Protein synthetisiert.
5 Der Expressionsvektor trägt hierzu alle zur Expression benötigten 5'- und 3'-Kontrollsignale.

Bei den sogenannten Translationsfusionen wird das vom einklonierten Fremdgen codierte Protein als Hybridprotein zusammen mit einem anderen Protein exprimiert,
10 das sich leicht nachweisen lässt. Die zur Expression benötigten 5'- und 3'-Kontrollsignale inklusive des Startcodons und eventuell ein Teil der für die N-terminalen Bereiche des zu bildenden Hybridproteins codierenden Sequenzen stammen vom Vektor. Der zusätzliche eingeführte Proteinteil stabilisiert nicht nur in vielen Fällen das vom einklonierten Fremdgen codierte Protein vor dem Abbau durch
15 zelluläre Proteasen, sondern lässt sich auch zum Nachweis und zur Isolierung des gebildeten Hybridproteins einsetzen. Die Expression kann sowohl transient, als auch stabil erfolgen. Als Wirtsorganismen eignen sich sowohl Bakterien, Hefen, Viren als auch eukaryotische Systeme.

20 **Reinigung der erfindungsgemäßen fluoreszierenden Proteine**

Die Isolierung von Proteinen (auch nach Überexpression) wird häufig als Proteinreinigung bezeichnet. Zur Proteinreinigung steht eine Vielzahl an etablierten Methoden und Verfahren zur Verfügung.

25

Die Fest-Flüssig-Trennung ist eine Grundoperation bei Proteinisolierungen. Sowohl bei der Abtrennung der Zellen vom Kulturmedium als auch bei der Klärung des Rohextraktes nach Zellaufschluss und Entfernung der Zelltrümmer, bei der Abtrennung von Niederschlägen nach Fällungen usw. ist der Verfahrensschritt
30 erforderlich. Er erfolgt durch Zentrifugation und Filtration.

Durch Gewinnung intrazellulärer Proteine muss die Zellwand zerstört bzw. durchlässig gemacht werden. Je nach Maßstab und Organismus werden dazu Hochdruckhomogenisatoren oder Rührwerkskugel- bzw. Glasperlenmühlen eingesetzt. Im Labormaßstab kommen u.a. mechanische Zellintegrationen und Ultraschallbehandlung zum Einsatz.

Sowohl für extrazelluläre als auch intrazelluläre Proteine (nach Zellaufschluss) sind verschiedene Fällungsverfahren mit Salzen (insbesondere Ammoniumsulfat) oder organischen Lösungsmitteln (Alkohole, Aceton) eine schnelle und defiziente Methode zur Konzentration von Proteinen. Bei der Reinigung intrazellulärer Proteine ist die Entfernung der löslichen Nucleinsäuren erstrebenswert (Fällung z.B. mit Streptomycin- oder Protaminsulfat. Bei der Gewinnung extrazellulärer Proteine werden häufig Träger (z.B. Stärke, Kieselgur) vor Zugabe der Fällungsmittel zugesetzt, um besser handhabbare Niederschläge zu erhalten.

Für die Feinreinigung stehen zahlreiche chromatographische und Verteilungsverfahren zur Verfügung (absorptions- und Ionenaustauschchromatographie, Gel-filtration, Affinitätschromatographie, Elektrophoresen. Eine Säulenchromatographie wird auch im technischen Maßstab angewandt. Für den Labormaßstab ist vor allem die Affinitätschromatographie von Bedeutung, die Reinigungsfaktoren bis zu mehreren 100 pro Schritt ermöglicht.

Extrazelluläre Proteine fallen in relativ verdünnten Lösungen an. Sie müssen ebenso wie extrazelluläre Proteine vor ihrer weiteren Verwendung konzentriert werden. Neben den schon erwähnten Verfahren hat sich – auch im industriellen Maßstab – die Ultrafiltration bewährt.

Anorganische Salze als Begleitstoffe von Proteinen sind für spezifische Anwendungen häufig unerwünscht. Sie können u.a. durch Gelfiltration, Dialyse und Diafiltration entfernt werden.

- 16 -

Zahlreiche Proteine kommen als Trockenpräparate zum Einsatz. Als Trocknungsverfahren sind die Vakuum-, Gefrier- und Sprühtrocknung von Bedeutung.

Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

5

Das fluoreszierende Protein CGFP wird durch die folgende Nukleotidsequenz codiert (SEQ ID NO: 1):

5`-

atgactgcacttaccgaaggagcaaaactgttcgagaaagaaattccctacattaca
10 gagttggaaggagacgttgaaggaatgaaattcatcatcaaaggtgaaggtactggc
gacgctactactggcaccatcaaagcgaaatatatttgcacaactggtgaccttcct
gtaccatgggctaccatcttgagtagtttgtcgtatgggtgttttctgtttcgctaag
tatccacgccacattgccgactttttcaagagcacacaaccagatgggtattcacaa
gacagaatcattagttttgacaatgatggacaatacgatgtcaaagccaagggttact
15 tatgaaaacggaacactttataatagagtcacagtc aaaggtactggcttcaaatca
aacggcaacatccttggtatgagagttctctaccattcaccaccacacgctgtctac
atccttcctgaccgtaaaaatgggtggcatgaaaattgaatacaataaggctttcgac
gttatgggcggtggtcaccaaattggcgcgtcacgccaattcaataaaccactagga
gcctgggaagaagattatccgttgatcatcatcttaccgtatggacttctttcgga
20 aaagatccggatgatgatgaaactgaccatttgaccatcgtcgaagtcacaaagct
gttgatttggaacataccgttga-3`.

Daraus ergibt sich eine Aminosäuresequenz von (SEQ ID NO: 2):

MTALTEGAKLFEKEIPYITELEGDVEGMKFIIKGEFTGDATTGTIKAKYICTTGDLF
25 VPWATILSSLSYGVFCFAKYPRHIADFFKSTQPDGYSQDRIISFDNDGQYDVKAKVT
YENGTLYNRVTVKGTGFKSNGNILGMRVLYHSPPHAVYILPDRKNGGMKIEYNKAFD
VMGGGHQMARHAQFNKPLGAWEEDYPLYHHLTVWTSFGKDPDDDETDLTLIVEVIKA
VDLETYR

30

Diese Sequenzen finden sich im Sequenzlisting wieder.

Beschreibung der Figuren

Die Fig. 1 zeigt die Plasmidkarte des Vektors pTriplEX2-CGFP .

5 Die Fig. 2 zeigt die Plasmidkarte des Vektors pcDNA3-CGFP .

Die Fig. 3 zeigt die transiente Emission von CGFP in CHO-Zellen im Expressionsvector pcDNA3-CGFP. Die Figur zeigt die mikroskopische Aufnahme der transient transfizierten Zellen bei einer Anregung von 480 nm und einer Emission von 520 nm.

10

Die Fig. 4 zeigt die Exitation des CGFP und des Kontrolllysates

Die Fig. 5 zeigt die Emission des CGFP und des Kontrolllysates

15

Die Fig. 6 zeigt das Aligment von CFGP, GFP (Aequoria) und GFP (Renilla) auf Aminosäureebene.

CGFP_Cly : CGFP aus Clytia gregaria

20 GFP_Ren : GFP aus Renilla

GFP_Aeq . GFP aus Aequoria

Die Fig. 7 zeigt das Aligment von CFGP, GFP (Aequoria) und GFP (Renilla) auf Nukleinsäureebene.

25 CGFP_Cly : CGFP aus Clytia gregaria

GFP_Ren : GFP aus Renilla

GFP_Aeq . GFP aus Aequoria

Beispiele

Beispiel 1

- 5 Als Vektor zur Herstellung des im folgenden dargestellten Konstruktes wurde das Plasmid pTriplEx2 der Firma Clontech verwendet. Das Derivat des Vektors wurde als pTriplEx2-CGFP bezeichnet. Der Vektor pTriplEx2-CGFP wurde zur Expression von CGFP in bakteriellen Systemen verwendet.
- 10 Die Fig. 1 zeigt die Plasmidkarte des Vektors pTriplEX2-CGFP .

Beispiel 2

- 15 Als Vektor zur Herstellung des im folgenden dargestellten Konstruktes wurde das Plasmid pcDNA3.1(+) der Firma Clontech verwendet. Das Derivat des Vektors wurde als pcDNA3-CGFP bezeichnet. Der Vektor pcDNA3-CGFP wurde zur Expression von CGFP in eukaryotischen Systemen verwendet.

- Die Fig. 2 zeigt die Plasmidkarte des Vektors pcDNA3-CGFP .
- 20

Beispiel 3

Bakterielle Expression

- 25 Die bakterielle Expression erfolgte im E. coli Stamm BL21(DE3) durch Transformation der Bakterien mit den Expressionsplasmiden pTriplEX2-CGFP und pTriplEX2. Die transformierten Bakterien wurden in LB-Medium bei 37°C für 3 Stunden inkubiert und die Expression für 4 Stunden durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Die induzierten Bakterien wurden durch
- 30 Zentrifugation geerntet, in PBS resuspendiert und durch Ultraschall aufgeschlossen. Die Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines Fluorometers bestimmt.

Beispiel 4**Eukaryotische Expression**

5

Die konstitutive eukaryotische Expression erfolgte in CHO-Zellen durch Transfektion der Zellen mit den Expressionsplasmiden pcDNA3-CGFP und pcDNA3.1(+) in transienten Experimenten. Hierzu wurden 10000 Zellen pro Loch in DMEM-F12 Medium auf 96 Loch Mikrotiterplatten plattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe des Fugene 6 Kits (Roche) nach Herstellerangaben. Die transfizierten Zellen wurden über Nacht bei 37°C in DMEM-F12 Medium inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte im Fluorometer bei Raumtemperatur.

10

Die Figur 3 zeigt die Expression von CGFP in CHO-Zellen.

Beispiel 5**Spektrum des fluoreszierenden Proteins CGFP**

20

Zur Messung des Emissionsspektrums wurden E. coli BL21(DE3) mit den Plasmiden pTriplEX2-CGFP und pTriplEX2 transformiert. Die Induktion erfolgte durch die Zugabe von 1 mM IPTG und einer Inkubation von 4 Stunden bei 37 °C. Anschließend wurden die Bakterien geerntet und in PBS resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Ultraschall. Anschließend erfolgte die Messung der Fluoreszenz im Fluorometer.

25

Die Figur 4 zeigt die Exitation des CGFP und des Kontrolllysates

30

Die Figur 5 zeigt die Emission des CGFP und des Kontrolllysates

Beispiel 6**BLAST****5 Ergebnis einer BLAST-Analyse von CFGP auf der Aminosäureebene.**

10 >AA2002:ABB06186 Abb06186 Green fluorescent protein GFPxm19 SEQ ID, NO:15.
5/2002, Length = 271, Score = 219 bits (558), Expect = 3e-56, Identities =
102/228 (44%), Positives = 151/228 (65%), Gaps = 3/228 (1%)

15 >gb|AAK02065.1| mutant green fluorescent protein [synthetic construct],
Length = 238, Score = 219 bits (557), Expect = 4e-56, Identities = 102/227
(44%), Positives = 150/227 (65%), Gaps = 3/227 (1%)

20 >gb|AAL33915.1|AF435430_1 green fluorescent protein [Aequorea macrodactyla],
Length = 238, Score = 218 bits (556), Expect = 5e-56, Identities = 102/227
(44%), Positives = 150/227 (65%), Gaps = 3/227 (1%)

25 >gb|AAL33918.1|AF435433_1 green fluorescent protein [Aequorea macrodactyla],
Length = 238, Score = 218 bits (555), Expect = 7e-56, Identities = 101/227
(44%), Positives = 149/227 (65%), Gaps = 3/227 (1%)

30 >gb|AAL33916.1|AF435431_1 green fluorescent protein [Aequorea macrodactyla],
Length = 238, Score = 218 bits (554), Expect = 9e-56
Identities = 102/227 (44%), Positives = 150/227 (65%), Gaps = 3/227 (1%)

35 >gb|AAL33917.1|AF435432_1 orange fluorescent protein [Aequorea
macrodactyla], Length = 238, Score = 218 bits (554), Expect = 9e-56,
Identities = 101/227 (44%), Positives = 149/227 (65%), Gaps = 3/227 (1%)

40 >AA2002:ABB06185 Abb06185 Green fluorescent protein GFPxm18 SEQ ID, NO:13.
5/2002, Length = 271, Score = 217 bits (552), Expect = 1e-55, Identities =
101/228 (44%), Positives = 151/228 (65%), Gaps = 3/228 (1%)

45 >AA2002:ABB06184 Abb06184 Green fluorescent protein GFPxm16 SEQ ID, NO:11.
5/2002, Length = 271, Score = 216 bits (551), Expect = 2e-55, Identities =
101/228 (44%), Positives = 150/228 (65%), Gaps = 3/228 (1%)

50 >AA2002:ABB06181 Abb06181 Green fluorescent protein GFPxm SEQ ID, NO:5.
5/2002, Length = 271, Score = 216 bits (551), Expect = 2e-55, Identities =
101/228 (44%), Positives = 150/228 (65%), Gaps = 3/228 (1%)

>gb|AAL33912.1|AF435427_1 green fluorescent protein [Aequorea macrodactyla],
Length = 238, Score = 216 bits (551), Expect = 2e-55, Identities = 101/227
(44%), Positives = 150/227 (65%), Gaps = 3/227 (1%)

>gb|AAK02064.1| mutant green fluorescent protein [synthetic construct],
Length = 238, Score = 216 bits (551), Expect = 2e-55, Identities = 101/227
(44%), Positives = 150/227 (65%), Gaps = 3/227 (1%)

Beispiel 7**BLAST**

5 Ergebnis einer BLAST-Analyse von CFGP auf Nukleinsäureebene.

10 >gb|AF468563.1| Crassostrea gigas clone c077 microsatellite sequence, Length
= 415, Score = 41.1 bits (21), Expect = 1.4, Identities = 25/27 (92%)

15 >gb|AC079685.2| Oryza sativa chromosome 10 clone OSJNBb0012A20, complete
sequence, Length = 131599, Score = 41.1 bits (21), Expect = 1.4, Identities
= 27/30 (90%)

20 >gb|AF427906.1|AF427906 Solenopsis globularia littoralis putative odorant
binding protein, precursor (Gp-9) gene, complete cds, Length = 1767, Score =
41.1 bits (21), Expect = 1.4, Identities = 23/24 (95%)

>gb|AF297617.1|AF297617 Echinococcus granulosus genotype 1 mitochondrion,
complete genome, Length = 13588, Score = 41.1 bits (21), Expect = 1.4,
Identities = 23/24 (95%)

Beispiel 8

25 Die Figur 6 zeigt das Aligment von CFGP, GFP (Aquoria) und GFP (Renilla) auf
Nukleinsäureebene.

Beispiel 9

30 Die Figur 7 zeigt das Aligment von CFGP, GFP (Aquoria) und GFP (Renilla) auf
Aminosäureebene.

Literatur / Patente

US patent no. 4,777,128

5 US patent no. 4,927,923

US patent no. 5,162,508

10 US patent no. 5,279,943

US patent no. 5,958,713

US patent no. 6,172,188

15 US patent no. 6,232,107

US patent no. 6,436,682

20 WO199623898

WO199711094

WO 199728261

25 WO1998/02571

WO199949019

30 WO200071565

WO200134824

WO200168824

WO200257451

5

Alam J, Cook JL. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem.* 1990 Aug 1;188(2):245-54

10

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997); Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs; *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402

15

Cardullo et al. (1988) Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:8790-8794

20

Cormier, M.J., Hori, K., Karkhanis, Y.D., Anderson, J.M., Wampler, J.E., Morin, J.G., and Hastings, J.W. (1973) Evidence for similar biochemical requirements for bioluminescence among the coelenterates. *J. Cell. Physiol.* 81, 291-298.

25

Cormier, M.J., Hori, K., and Anderson, J.M. (1974) Bioluminescence in coelenterates. *Biochim. Biophys. Acta* 346, 137-164.

Cullen Bryan R., Malim Michael H., Secreted placental alkaline phosphatase as a eukaryotic reporter gene. *Methods in Enzymology.* 216:362ff

Davenport, D. and Nicol, J.A.C. (1955) Luminescence in Hydromedusae. *Proc. R. Soc. B* 144, 399-411.

30

Delagrave et al., Red-shifted excitation mutants of the green fluorescent protein, *Bio/Technology* 13(2):151-154 (1995)

5 **Ehrig et al.**, Green-fluorescent protein mutants with altered fluorescence excitation spectra, *FEBS Letters* 367:163-166 (1995)

Hastings, J.W. and Morin, J.G. (1969) Comparative biochemistry of calcium-activated photoproteins from the ctenophore, *Mnemiopsis* and the coelenterates *Aequorea*, *Obelia*, and *Pelagia*. *Biol. Bull.* 137, 402.

10 **Heim et al.**, (1996) Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer, *Current Biology* 6(2):178-182 (1996).

15 **Inouye S, Tsuji FI.** (1994) *Aequorea* green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett* 1994 Mar 21;341(2-3):277-80

20 **Johnson, F.H., Shimomura, O., Saiga, Y., Gershman, L.C., Reynolds, G.T., and Waters, J.R.** (1962) Quantum efficiency of *Cypridina* luminescence, with a note on that of *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 60, 85-103.

25 **Krieg, S., Castles, C., Allred, D., Benedix, M., Fuqua S.**, RNA from air-dried frozen sections for RT-PCR and differential display. *Biotechniques*. 1996 Sep;21(3):425-8.

30 **Levine, L.D. and Ward, W.W.** (1982) Isolation and characterization of a photoprotein, "phialidin", and a spectrally unique green-fluorescent protein from the bioluminescent jellyfish *Phialidium gregarium*. *Comp. Biochem. Physiol.* 72B, 77-85.

Mitra et al., Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein, *Gene* 73(1):13-17 (1996).

- 5 **Morin, J.G. and Hastings, J.W.** (1971) Biochemistry of the bioluminescence of colonial hydroids and other coelenterates. *J. Cell. Physiol.* 77, 305-311.

Morin, J.G. and Hastings, J.W. (1971) Energy transfer in bioluminescent system. *J. Cell. Physiol.* 77, 313-318.

10

Phillips GN. Structure and dynamics of green fluorescent protein. *Curr Opin Struct Biol.* 1997 Dec;7(6):821-7

15

Shimomura O., Bioluminescence in the sea: photoprotein systems. *Symp Soc Exp Biol.* 1985;39:351-72.

Snowdowne KW, Borle AB. Measurement of cytosolic free calcium in mammalian cells with aequorin. *Am J Physiol.* 1984 Nov;247(5 Pt 1):C396-408.

20

Ward, W.W. (1998) Biochemical and physical properties of green fluorescent protein. In: *Green Fluorescent Protein: Properties, Applications, and Protocols* (Chalfie, M. and Kain, S., eds) pp. 45-70. Wiley-Liss, Inc.

25

Ward et al., Energy Transfer Via Protein-Protein Interaction in Renilla Bioluminescence Photochemistry and Photobiology 27:389-396 (1978).

Wampler, J.E., Hori, K., Lee, J.W., and Cormier, M.J. (1971) Structured bioluminescence. Two emitters during both the *in vitro* and the *in vivo* bioluminescence of the sea pansy, *Renilla*. *Biochemistry* 10, 2903-2909.

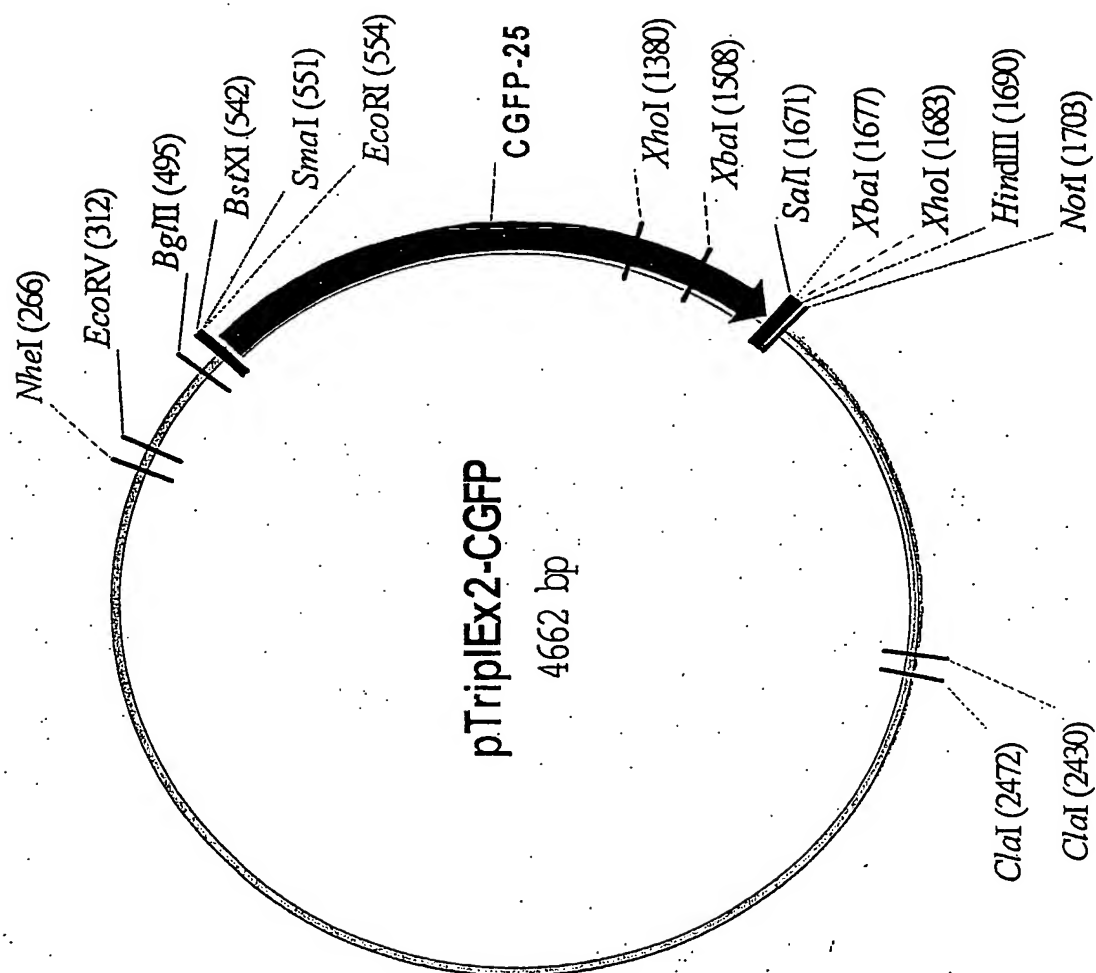
30

- Wampler, J.E., Karkhanis, Y.D., Morin, J.G., Cormier, M.J. (1973) Similarities in the bioluminescence from the *Pennatulacea*. *Biochim. Biophys. Acta* 314, 104-109.
- 5 Yang Te-Tuan, Sinai Parisa, Kitts Paul A. Kain Seven R., Quantification of gene expression with a secreted alkaline phosphatase reporter system. *Biotechnology*. 1997 23(6) 1110ff

Patentansprüche

1. Nukleinsäuremolekül, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
 - 5 a) Nukleinsäuremolekülen, die das Polypeptid offenbart durch SEQ ID NO: 2 kodieren;
 - b) Nukleinsäuremolekülen, welche die durch SEQ ID NO: 1 dargestellte Sequenz enthalten;
 - 10 c) Nukleinsäuremolekülen, deren komplementärer Strang mit einem Nukleinsäuremolekül aus a) oder b) unter stringenten Bedingungen hybridisiert und welche die biologische Funktion eines fluoreszierenden Proteins aufweisen;
 - 15 d) Nukleinsäuremolekülen, welche sich auf Grund der Degenerierung des genetischen Kodes von den unter c) genannten unterscheiden;
 - e) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 95% zu SEQ ID NO: 1 zeigen, und welche die biologische Funktion eines fluoreszierenden Proteins aufweisen; und
 - 20 f) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 65% zu SEQ ID NO: 1 zeigen, und welche die biologische Funktion eines fluoreszierenden Proteins aufweisen.
 - 25
2. Moleküle nach Anspruch 1, bei denen die Sequenz einen funktionalen Promotor 5' zur Sequenz enthält.
- 30 3. Moleküle nach Anspruch 2, die Bestandteil von rekombinanten DNA oder RNA Vektoren sind.

4. Organismen, die einen nach Anspruch 3 beschriebenen Vektor enthalten.
- 5 5. Oligonukleotide mit mehr als 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, die identisch oder komplementär zu DNA oder RNA Sequenzen nach Anspruch 1 sind.
6. Peptide, die durch die Nukleotidesequenzen nach Anspruch 1 kodiert sind.
- 10 7. Verfahren zur Expression der CGFP Polypeptide gemäss Anspruch 6 in Bakterien, eukaryontischen Zellen oder in *in vitro* Expressionssystemen.
8. Verfahren zur Aufreinigung/Isolierung eines CGFP Polypeptides gemäss Anspruch 6.
- 15 9. Peptide mit mehr als 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren, die immunologisch durch Antikörper gegen das fluoreszierende Protein CGFP erkannt werden.
- 20 10. Verwendung des fluoreszierenden Proteins CGFP gemäß den Ansprüchen 1 bis 7 als Marker- und Reportergen.



Figuren

Fig. 1

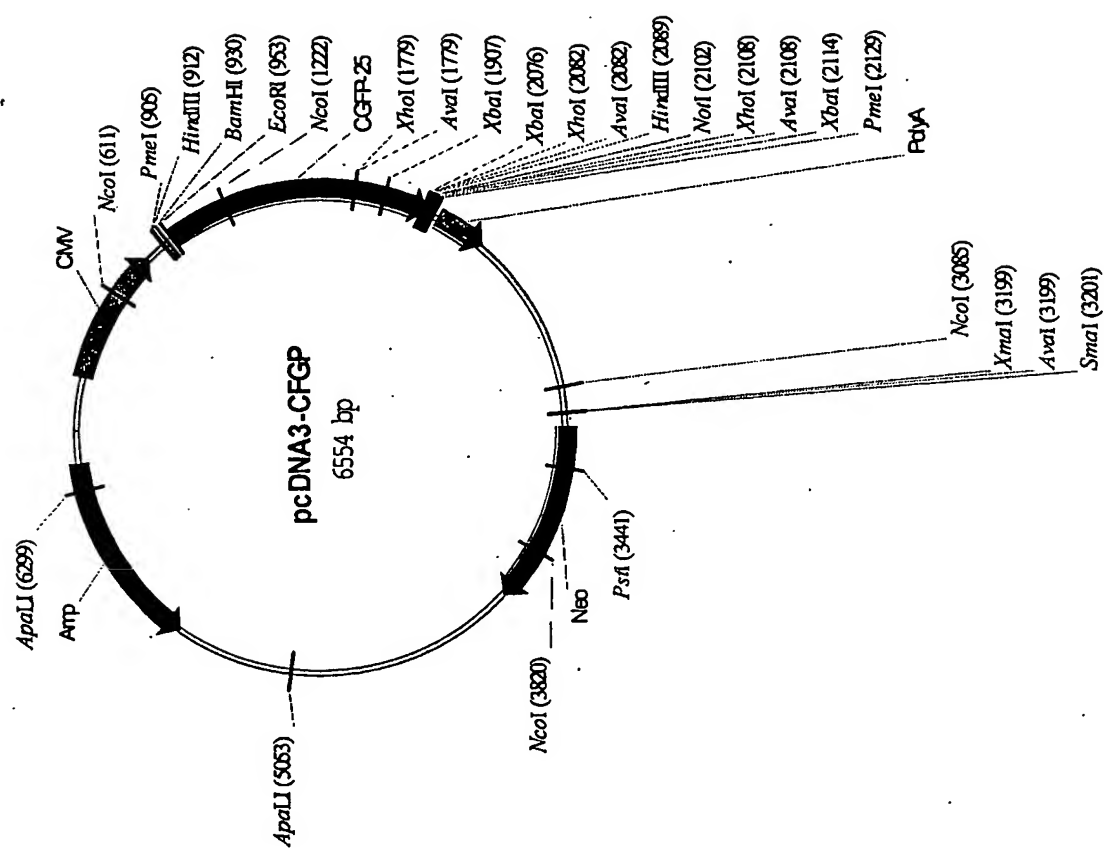


Fig. 2

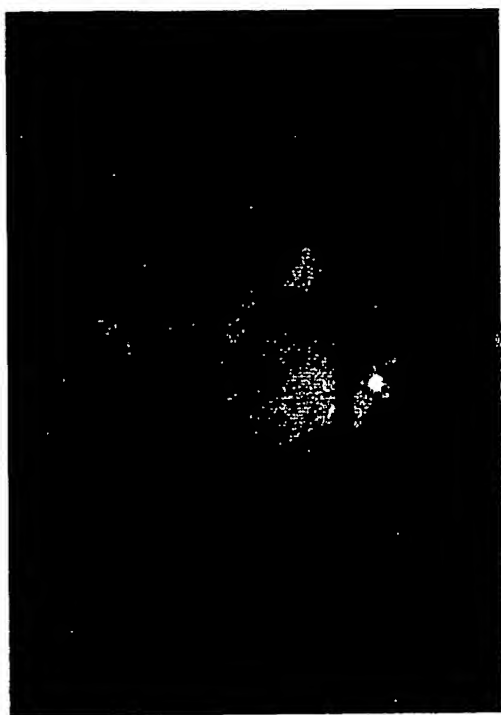


Fig. 3

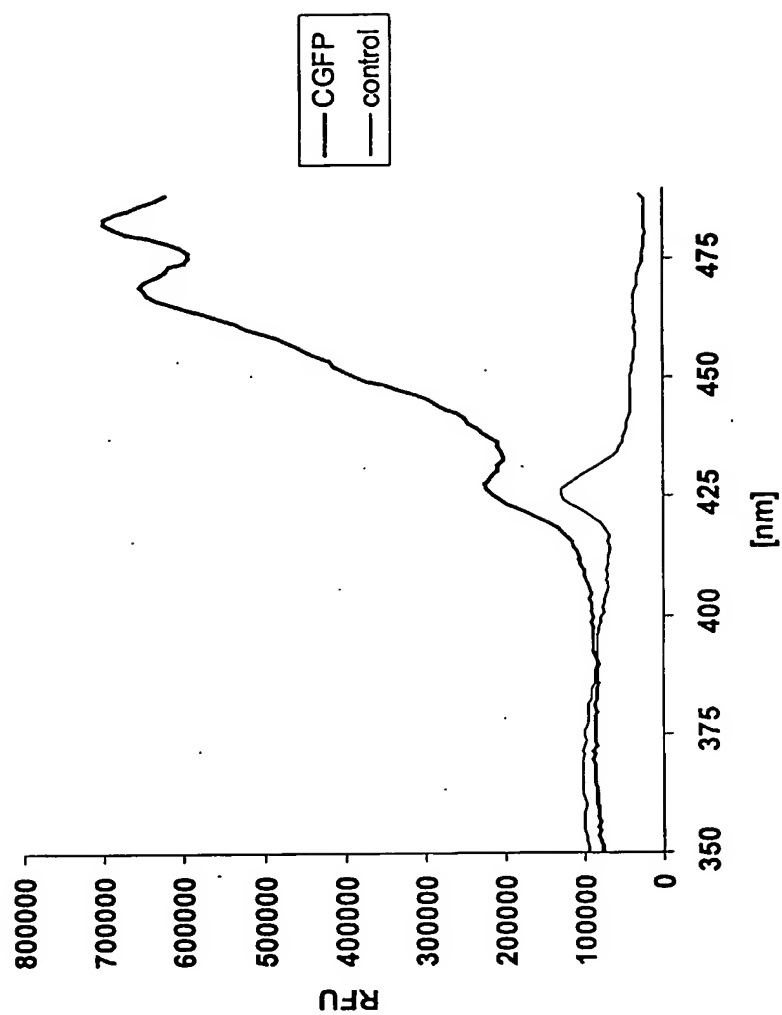


Fig. 4

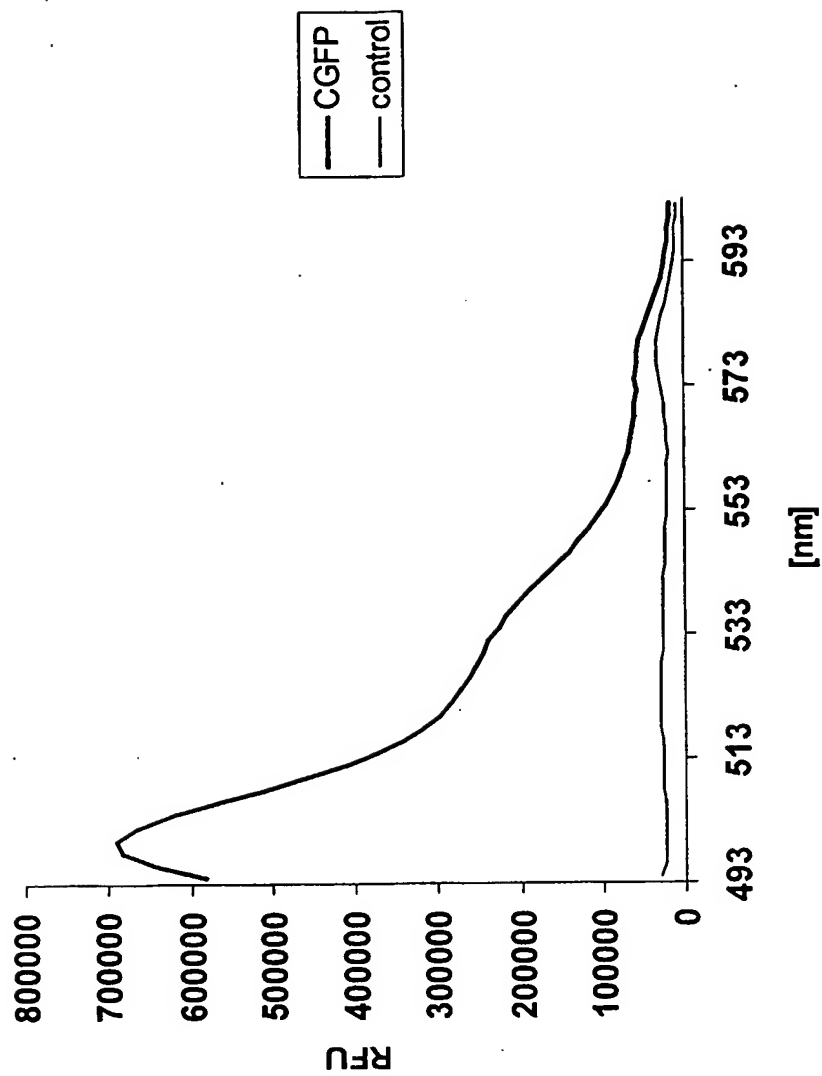


Fig. 5

Fig. 6

```

CGFP_Cly 000:MTALTEGAKLFEKEIPYITELEGDVEGMKFIKGEGTGDAITGTIKAKYICTTGD-LPVP
GFP_Aeq 000:...MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGQKFSVSGEGDATYKLTCLKFICTTGK-LPVP
GFP_Ren 000:MSKQILKNTCLQEVMSYKVNLEGI VNNHVFTMEGCGKGNILFGNQLVQIRVTKGAPLPFA

CGFP_Cly 060:WATILSSLSYGVCFAKYPRHIA--DFFKSTQPDGYSQDRISFDNDGQYDVKAKVTYEN
GFP_Aeq 060:WPTLVTTTFSYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFYKDDGNYKTRAEVKFEG
GFP_Ren 060:FDIVSPAFAQYGNRTFTTKYPNDIS--DYFIQSFPAQFMYERTLRYEDGGLVEIRSDINLIE

CGFP_Cly 120:GTLYNRVTVKGTGFKSNGNILGMRVL YHSPHAVYILPDRKNGGMKIEYNKAFDVMGGGH
GFP_Aeq 120:DTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKMEYNYNSHNVYIMADKPKNGIKVNFKIRHNIKDGSV
GFP_Ren 120:DKFVYRVEYKGSNFPDDGPMQKTI LGIEPSFEAMYM---NNGVLVGEVILVYKLSGK

CGFP_Cly 180:QMARHAQFNKPLGAWEE DYPLYHHLT--VWTSFGKDPDDDETDLTIVEVIKAVDL-----
GFP_Aeq 180:QLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNH YLS--TQSALSKDP-NEKRDHMILLEFVTAAGITHGM
GFP_Ren 180:YYSCHMKTLMKSKGVVKEFPSYHFIQHRLEKTYVEDGGFVEQHETAIAQMTSIGKPLGSL

CGFP_Cly 240:-ETYR
GFP_Aeq 240:DELYK
GFP_Ren 240:HEWV

```

Fig. 7

CGFP_Cly_000:atgactgcacttacccaaggagcaaaaactgttcgagaaagaaatccctacattacagag
GFP_Ren_000:atgagtaaacaaatatgaagaacacctgtttacaagaagtaatgtcgtataaagtaaat
GFP_Aeq_000:atgagtaaaaggagaagaacttttcactggagttgtcccaattcttgttgaattagatggc

CGFP_Cly_060:ttggaaggagacgttgaaaggaatgaaattcatcaaaagtgaaagtactggcgacgct
GFP_Ren_060:ctggaagggaattgtaaaccaacctgttttacaatggaggttgcggaagggaatat
GFP_Aeq_060:gatgttaatgggcaaaaattctctgtcagtgagaggtgaaagtgatgcaacatacggga

CGFP_Cly_120:actactggcaccatcaaaagcgaaatatatttgacaaactggtgaccttcctgtaccatgg
GFP_Ren_120:ttattcggcaatcaactgggttcagattcgtgtcacgaaagggcccccactgccttttgca
GFP_Aeq_120:aaacttaccctttaaatttatttgccactactgggaagctacctgttccatggccaacactt

CGFP_Cly_180:gctaccatcttgagtagttgtcgtatggtgttttctgttcgctaagtatccacgccac
GFP_Ren_180:tttgatattgtgtcaccagcttttcaatatggcaaccgtactttcacgaaatatccgaat
GFP_Aeq_180:gtcactactttctcttatgggttcaatgcttttcaagataccagatcatatgaaacag

CGFP_Cly_240: attgccgactttttcaagagcacacaaccagatggttattcacaaagacagaatcattagt
GFP_Ren_240: gatataatcagattatttatacaatcatttccagcaggatttatgtatgaacgaacatta
GFP_Aeq_240: catgactttttcaagagtcccatgcccgaaggttatgtacaggaaagaactatattttac

CGFP_Cly_300: tttgacaatgatggacaatacgaatgtcaaaagccaaggttactttatgaaaaacggaacactt
GFP_Ren_300: cgttacgaagatggcggacttgttgaaattcgttcagatatataaatttaataagaagacaag
GFP_Aeq_300: aaagatgacgggaactacaagacacgctgctgaagtcaagttgaagggtgatacccttggt

CGFP_Cly_360: tataatagagtcacagtcaaaggtagctggttcaaatcaaacggcaacatccttggtatg
GFP_Ren_360: ttcgtctacagagtgaatacaaaaggtagtaacttcccagatgatgggtccgtcatgcag
GFP_Aeq_360: aatagaatcgagttaaaaggatttgattttaaagaagatggaaacattcttggacacaaa

CGFP_Cly_000: atgactgcacttaccgaaggagcaaaaactgttcgagaaagaaattccctacattacagag
GFP_Ren_000: atgagtaaacaaaatattgaagaacacttgtttacaagaagtaatgtcgtataaaagtaaat
GFP_Aeq_000: atgagtaaggagaagaacttttcactggagttgtcccaattctgttgaattagatggc

CGFP_Cly_060: ttggaaggagacgttgaaaggaatgaaattcatcatcaaaaggtgaaggtagtggcgacgct
GFP_Ren_060: ctggaagggaattgtaaacacaccatgtttttacaatggagggttgcggcaaaaggaatatt
GFP_Aeq_060: gatgttaatgggcaaaaattctctgtcagtgagaggggtgaagggtgatgcaacatacggga

CGFP_Cly_120:actactggcaccatcaaagcgaaatatattgcacaactggtgaccttcctgtaccatgg
GFP_Ren_120:ttattcggcaatcaactggttcagattcgtgtcacgaaagggcccccactgccttttgca
GFP_Aeq_120:aaactacccttaaatattattgcactactgggaagctacctgttccatggccaacactt

CGFP_Cly_180:gctaccatcttgagtagtttgctgtagtgggtgttttctgtttcgttaagtatccacgccac
GFP_Ren_180:tttgataattgtgtcaccagcttttcaatatggcaaccgtactttcacgaaatatccgaat
GFP_Aeq_180:gtcactactttctcttatggtgttcaatgcttttcaagatacccagatcatatgaaacag

CGFP_Cly_240:attgccgactttttcaagagcacacaaccagatggttattcacaaagacagaatcattagt
GFP_Ren_240:gatatatcagattattttatacaatcatttccagcaggatttattgtatgaacgaacatta
GFP_Aeq_240:catgactttttcaagagtgccatgcccgagggttatgtacaggaaagaactatatatttac

CGFP_Cly_300:tttgacaatgatggacaatacgaatgtcaaagccaaggttacttatgaaaacggaacactt
GFP_Ren_300:cgttacgaagatggcggacttgttgaaatcgttcagatatataaatttaatagaagacaag
GFP_Aeq_300:aaagatgacgagggaactacaagacacgtgctgaagtcaaagtttgaagggtgatacccttgtt

CGFP_Cly_360:tataatagagtcacagtcaaaaggtagtggcttcaaatcaaacggcaacatccttggtagt
GFP_Ren_360:ttcgtctacagagtggaaatacaaaaggtagtaacttcccagatgatgggtcccgatgcag
GFP_Aeq_360:aatagaatcgagttaaaaggtagtattgattttaagaagatggaaacatttcttggacacaaa

CGFP_Cly_420:agagttcttaccattcaccaccacacgctgtctacatccttcctgaccgtaaaaatggt
GFP_Ren_420:aagactatcttaggaatagagccttcatttgaagccatgtacatgaataatggcgctcttg
GFP_Aeq_420:atggaatacaactataactcacataatgtatacatcatggcagacaaaacaaagaatgga

CGFP_Cly_480:ggcatgaaaattgaatacaataaggcttctcgacgttatggcggtggtcaccaaaatggcg
GFP_Ren_480:gtcggcgaaagtaattcttgtctataaaactaaactctgggaaaatattattcatgtcacatg
GFP_Aeq_480:atcaaagtttaacttcaaaattagacacaacattaaagatggaaagcgttcaattagcagac

CGFP_Cly_540:cgtcacgcccattcaataaaccactaggagcctgggaagaagattatccgttgtatcat
GFP_Ren_540:aaaacattaatgaagtcgaaaggtagtaaaaggagtttccttcgtatcattttatttcaa
GFP_Aeq_540:cattatcaacaaaaatactccaattggcgatggcctgtccttttaccagacaaccattac

CGFP_Cly_600:catcttaccgtatggacttcttttcggaaaaagatccggatgatgaaactgaccatttg
GFP_Ren_600:catcgtttggaaaagacttacgtagaagacgggggttcggtgaacagcatgagactgct
GFP_Aeq_600:ctgtccacacaatctgccctttccaagatcccaacgaaaagagatcacatgatcctt

CGFP_Cly_660:accatcgtcgaagtcatcaaaagctgttgatttggaaacataccgttga-----
GFP_Ren_660:attgctcaaatgacatctatagggaaaaccactaggatccttacacg-----aatg
GFP_Aeq_660:cttgagtttgtaacagctgctgggttacacatggcatggcatggaactatacaataaatg

CGFP_Cly_720:-----
GFP_Ren_720:-----g--gt-----ttaa
GFP_Aeq_720:tccagacttccaattga

- 1 -

SEQUENCE LISTING

<110> Bayer AG, BHC

<120> Isoliertes fluoreszierendes Protein CGFP, sowie dessen Verwendung

<130> Le A 36 493

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 708

<212> DNA

<213> Clytia gregaria

<400> 1

```

atgactgcac ttaccgaagg agcaaaactg ttcgagaaag aaattcccta cattacagag      60
ttggaaggag acgttgaagg aatgaaattc atcatcaaag gtgaaggtag tggcgacgct      120
actactggca ccatcaaagc gaaatatatt tgcacaactg gtgaccttcc tgtaccatgg      180
gctaccatct tgagtagttt gtcgtatggt gttttctggt tcgctaagta tccacgccac      240
attgccgact ttttcaagag cacacaacca gatggttatt cacaagacag aatcattagt      300
tttgacaatg atggacaata cgatgtcaaa gccaaaggta cttatgaaaa cggaacactt      360
tataatagag tcacagtcaa aggtactggc ttcaaataca acggcaacat ccttggtatg      420
agagttctct accattcacc accacacgct gtctacatcc ttcctgaccg taaaaatggt      480
ggcatgaaaa ttgaatacaa taaggctttc gacgttatgg gcggtggtca ccaaatggcg      540
cgtcacgccc aattcaataa accactagga gcctgggaag aagattatcc gttgtatcat      600
catcttaccg tatggacttc tttcgaaaaa gatccggatg atgatgaaac tgaccatttg      660
accatcgctg aagtcatcaa agctgttgat ttggaaacat accgttga      708

```

<210> 2

<211> 235

<212> PRT

<213> Clytia gregaria

<400> 2

```

Met Thr Ala Leu Thr Glu Gly Ala Lys Leu Phe Glu Lys Glu Ile Pro
1           5           10           15
Tyr Ile Thr Glu Leu Glu Gly Asp Val Glu Gly Met Lys Phe Ile Ile
           20           25           30
Lys Gly Glu Gly Thr Gly Asp Ala Thr Thr Gly Thr Ile Lys Ala Lys
           35           40           45
Tyr Ile Cys Thr Thr Gly Asp Leu Pro Val Pro Trp Ala Thr Ile Leu
50           55           60

```


INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/13281

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K14/435 A01K67/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEVINE L D ET AL: "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A PHOTO PROTEIN PHIALIDIN AND A SPECTRALLY UNIQUE GREEN FLUORESCENT PROTEIN FROM THE BIO LUMINESCENT JELLYFISH PHIALIDIUM-GREGARIUM" COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY B, vol. 72, no. 1, 1982, pages 77-86, XP009028577 ISSN: 0305-0491 cited in the application	1, 2, 5, 6, 8, 9
Y	abstract page 79, right-hand column, paragraph 2 -page 80, right-hand column, paragraph 1; figure 3; table 3 --- -/--	3, 4, 7, 10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 Apr11 2004

Date of mailing of the international search report

12/05/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Weiland, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/13281

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>CHALFIE, M. AND KAIN, S.: "Green fluorescent protein: properties, applications, and protocols" August 1998 (1998-08) , WILEY-LISS, INC. XP009028583 cited in the application page 49; figure 3.3 page 70</p> <p style="text-align: center;">---</p>	3,4,7,10
Y	<p>PRASHER D C: "Using GFP to see the light" TRENDS IN GENETICS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 11, no. 8, 1995, pages 320-323, XP004207387 ISSN: 0168-9525 page 322, right-hand column, paragraph 5 -page 323, left-hand column, paragraph 2; figure 2; table 1</p> <p style="text-align: center;">---</p>	3,4,7,10
Y	<p>TSIEN R Y: "THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN" ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY, PALTO ALTO, CA, US, vol. 67, 1998, pages 509-544, XP000946725 ISSN: 0066-4154 page 511, paragraph 3 page 539, paragraph 3</p> <p style="text-align: center;">---</p>	3,4,7,10
A	<p>INOUE SATOSHI ET AL: "Cloning and sequence analysis of cDNA for the calcium-activated photoprotein, clytin" FEBS (FEDERATION OF EUROPEAN BIOCHEMICAL SOCIETIES) LETTERS, vol. 315, no. 3, 1993, pages 343-346, XP001180448 ISSN: 0014-5793 page 343, right-hand column, paragraph 1</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-10
A	<p>PRASHER D C ET AL: "PRIMARY STRUCTURE OF THE AEQUOREA VICTORIA GREEN-FLUORESCENT PROTEIN" GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 111, 1992, pages 229-233, XP001018985 ISSN: 0378-1119 figure 2</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-10
X	<p>-& DATABASE GENBANK 'Online! 26 April 1993 (1993-04-26) PRASHER ET AL.: "Primary Structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein" Database accession no. M62653 XP002276253 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-3,5

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/13281

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07K14/435 A01K67/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LEVINE L D ET AL: "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A PHOTO PROTEIN PHIALIDIN AND A SPECTRALLY UNIQUE GREEN FLUORESCENT PROTEIN FROM THE BIO LUMINESCENT JELLYFISH PHIALIDIUM-GREGARIUM" COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY B, Bd. 72, Nr. 1, 1982, Seiten 77-86, XP009028577 ISSN: 0305-0491 in der Anmeldung erwähnt	1,2,5,6, 8,9
Y	Zusammenfassung Seite 79, rechte Spalte, Absatz 2 -Seite 80, rechte Spalte, Absatz 1; Abbildung 3; Tabelle 3 --- -/--	3,4,7,10



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. April 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

12/05/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Weiland, S

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	CHALFIE, M. AND KAIN, S.: "Green fluorescent protein: properties, applications, and protocols" August 1998 (1998-08) , WILEY-LISS, INC. XP009028583 in der Anmeldung erwähnt Seite 49; Abbildung 3.3 Seite 70	3,4,7,10
Y	PRASHER D C: "Using GFP to see the light" TRENDS IN GENETICS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 11, Nr. 8, 1995, Seiten 320-323, XP004207387 ISSN: 0168-9525 Seite 322, rechte Spalte, Absatz 5 -Seite 323, linke Spalte, Absatz 2; Abbildung 2; Tabelle 1	3,4,7,10
Y	TSIEN R Y: "THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN" ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY, PALTO ALTO, CA, US, Bd. 67, 1998, Seiten 509-544, XP000946725 ISSN: 0066-4154 Seite 511, Absatz 3 Seite 539, Absatz 3	3,4,7,10
A	INOUE SATOSHI ET AL: "Cloning and sequence analysis of cDNA for the calcium-activated photoprotein, clytin" FEBS (FEDERATION OF EUROPEAN BIOCHEMICAL SOCIETIES) LETTERS, Bd. 315, Nr. 3, 1993, Seiten 343-346, XP001180448 ISSN: 0014-5793 Seite 343, rechte Spalte, Absatz 1	1-10
A	PRASHER D C ET AL: "PRIMARY STRUCTURE OF THE AEQUOREA VICTORIA GREEN-FLUORESCENT PROTEIN" GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 111, 1992, Seiten 229-233, XP001018985 ISSN: 0378-1119 Abbildung 2	1-10
X	-& DATABASE GENBANK 'Online! 26. April 1993 (1993-04-26) PRASHER ET AL.: "Primary Structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein" Database accession no. M62653 XP002276253 das ganze Dokument	1-3,5